

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-230553

(43)Date of publication of application : 19.08.2003

(51)Int.Cl.

A61B 5/22

(21)Application number : 2002-031329

(71)Applicant : OG GIKEN CO LTD

(22)Date of filing : 07.02.2002

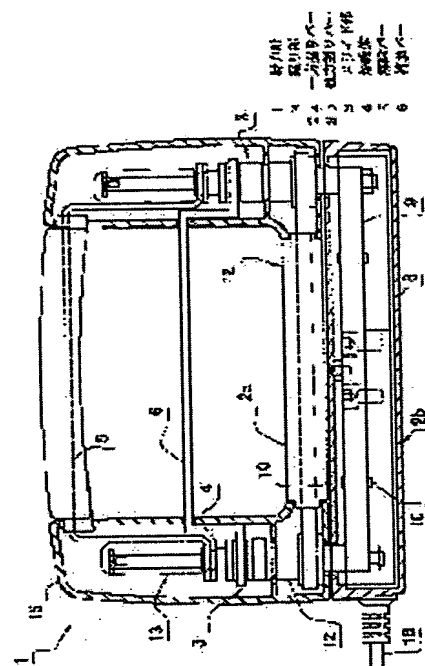
(72)Inventor : SUMINO AYUMI
HATSUTORI MICHINAO
FUJIMURA KAZUO

(54) SLIDING TYPE DYNAMOMETER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a sliding type dynamometer wherein a distance regulation between two gripping elements can be quickly performed by a simple operation.

SOLUTION: This dynamometer (1) has two gripping bars (2a) and (2b). In such a dynamometer (1), a sliding unit (3) which slidably connects two gripping bars (2a) and (2b), and a releasing element (4) which fixes/releases the action of the sliding unit (3) are provided. Thus, an interval between the two gripping bars (2a) and (2b) can be freely changed/regulated. In this case, the sliding unit (3) is provided on both ends of the gripping unit (2), and the right and left releasing elements (4) and (4) which are provided on the right and left sliding units (3) and (3) are integrally connected by a releasing bar (5) for the sliding type dynamometer.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

18.05.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3737761

[Date of registration]

04.11.2005

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-250553
(P2003-250553A)

(43) 公開日 平成15年9月9日 (2003.9.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		9/88	4 B 0 5 0
9/88		15/00	Z N A A 4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2002-49172 (P2002-49172)

(22) 出願日 平成14年2月26日 (2002.2.26)

(71) 出願人 000000206

宇部興産株式会社

山口県宇部市大字小串1978番地の96

(72) 発明者 大島 敏久

徳島県徳島市新浜町2丁目3-75 新浜住宅1-5-5

(72) 発明者 櫻庭 春彦

徳島県徳島市新浜町2丁目4番地 20-3202

(72) 発明者 川上 竜巳

徳島県徳島市新浜町2丁目53番地 パークハイツ402

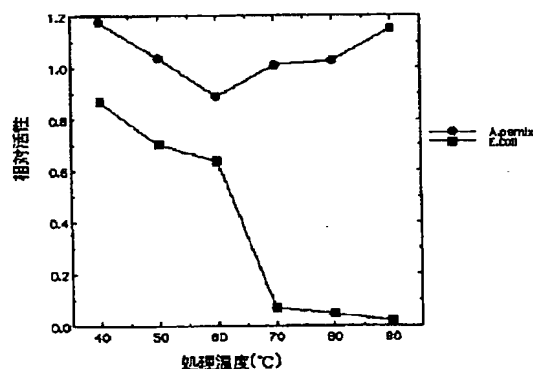
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ

(57) 【要約】

【課題】 耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼおよびその製法を提供すること。

【解決手段】 エアロパイラム・ペルニックス (*Aeropyrum pernix*) に属する微生物から新規耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを単離する。この酵素をコードするDNA、このDNAを含む発現ベクターで、形質転換した宿主細胞を培養することによって新規耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼの製造方法を確立した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】80℃で、10分の熱処理後、少なくとも80%以上の活性が残存する耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ。

【請求項2】超好熱菌エアロパイラム・ペルニックス(*Aeropyrum pernix*)に属する微生物から得られる請求項1の耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ。

【請求項3】下記の(1)又は(2)のポリヌクレオチド、(1)配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチド、(2)配列番号1の塩基配列からなるポリヌクレオチドにおいて1もしくは数個のヌクレオチドが欠失、置換もしくは付加されたポリヌクレオチドであって、請求項1の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項4】下記の(1)又は(2)のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、(1)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(2)配列番号2のアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸が欠失し、一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され或いは他のアミノ酸残基が挿入又は付加されたポリペプチドであって、請求項1の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項5】下記の(1)又は(2)のポリペプチド、(1)配列番号2のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(2)配列番号2のアミノ酸配列において、その一部のアミノ酸が欠失し、一部のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換され或いは他のアミノ酸残基が挿入又は付加されたポリペプチドであって、請求項1の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ活性を有するポリペプチド。

【請求項6】請求項3または4に記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項7】請求項6の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項8】大腸菌又はその誘導体であることを特徴とする、請求項7に記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐熱性を有する2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼおよび該2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼをコードする遺伝子とその利用に関するものである。2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(EC4.1.2.4)は、2-デオキシリボース-5-リン酸をアセトアルデヒドとグリセロアルデヒド-3-リン酸に分解する反応と同時に可逆的にアセトアルデヒドとグリセロアルデヒド-3-リン酸から2-デオキシリボース-5-リン酸を合成する反応を触媒する。

【0002】

【従来技術】大腸菌由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(EC4.1.2.4) (以下DERAと略称)は、比較的広い基質特異性を持ち、非天然の合成基質からキラル

化合物を合成することが報告されている。(Angew. Chem. Int. Ed. 39, 1352-1374 (2000))

【0003】DERAによって得られた反応物は、光学活性な中間体として、医薬中間体、光学系材料に重要である。例えば、Synthesis, 1469-1472 (1999)には、抗ガン活性を有する天然物エポチロン(epotilone)の合成などに利用されている。しかし、本酵素の非天然基質に対する活性は低く、反応には大量の酵素が必要であり、前記エポチロンの中間体の合成では、目的物308mgを得るために368mg (3500U) (実施例3参照)が必要である。反応時、大量の酵素が必要であるにもかかわらず大腸菌由来の酵素であるため、常温で不安定であり、且つ、本酵素の精製に種々のカラム操作など5工程を要し、多量の酵素が必要な工業的プロセスとしては、適切ではない。また、本酵素を用いた工業スケールでの生産は実現していない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】超好熱菌由来酵素は、熱や有機溶媒等、常温菌由来酵素が失活する様々な外部要因に対して安定性が高く、工業的に有用な酵素を探索する上で貴重な生物資源である。いくつかの酵素については、同様の活性を有する中温菌由来のものに比べて著しく高い耐熱性を有している。例えば、特開平10-234387公報には、超好熱菌*Thermococcus* sp. B-1001株由来の超耐熱性サイクロデキストリン生成酵素が高い耐熱性を有することが記載されている。しかし、超好熱菌由来の2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)には、単離精製された報告は無い。

【0005】超好熱菌エアロパイラム・ペルニックス(*Aeropyrum pernix*)は日本の海洋熱水環境から見出された超好熱古細菌であり、独立行政法人製品評価技術基盤機構がゲノム情報を公開している。この情報を元に大腸菌由来のDERAとの相同性から、配列番号3に示すヌクレオチド配列がDERAをコードするORF(オープンリーディングフレーム)として推定されている。(DNA Research, 6, 83-101. (1999))この知見に基づき、配列番号3に示すヌクレオチド配列をエアロパイラム・ペルニックスのゲノムから、PCR反応で増幅し抽出後、蛋白質発現プラスミドpET11aに挿入し、そのプラスミドを大腸菌に組み込み、発現させたが、発現したタンパクには、DERA活性は認められなかった。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、超好熱菌エアロパイラム・ペルニックスを培養し、その菌体破砕物中に2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)活性を見出し、DERA活性を指標として精製を進めて、酵素を精製することに成功した。本酵素は、大腸菌由来の酵素と異なり、高い熱安定性を有していた。また、本酵素のN末端配列(配列番号4)を決定した結果、配列番号1に示す本酵素をコードする遺伝子を決定した。決定

した遺伝子はゲノム情報より推定されていた遺伝子(配列番号3)よりも126残基上流からはじまり、その開始コドンは、生物種共通のATGではなく、エアロパイラム・ペルニックス独特の開始コドンであるTTGであることが明らかになった。一般にタンパク合成の開始コドンはATGであるが、エアロパイラム・ペルニックスでは独特の開始コドンであるTTGが利用されることがグルタミン酸脱水素酵素で報告されている。(Extremophiles 4 333-341 2000年)

本発明者は、さらに、本酵素を他の微生物に組み込み、大量に生産するために大腸菌への組換え発現を検討した。大腸菌において発現させるにあたり、開始コドンをTTGから、ATGに変換した配列番号5に示すポリヌクレオチドを大腸菌に組み込んだところ、組換え発現に成功し耐熱性を備えたDERA活性を確認した。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の耐熱性2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼを得るために利用され得る超好熱菌エアロパイラム・ペルニックス(*Aeropyrum pernix* K1)は、理化学研究所微生物系統保存施設より、入手できる(登録番号JCM9820)。エアロパイラム・ペルニックス染色体DNAは、例えば、*Biochimica et Biophysica Acta*, 72 619 (1963)の方法を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作成することができる。2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ(DERA)の活性測定法は、*Eur. J. Biochem.* 125, 561-566 (1982年)、又は、*J. Am. Chem. Soc.*, vol 117 3333-3339 (1995年)に記載の方法により測定できる。

【0008】酵素の精製に関しては、*Biochimica et Biophysica Acta*, 1118 130-133 (1992)等、公知の技術の組み合わせにより達成できる。精製されたDERAを用いて、本酵素のN末端アミノ酸配列を決定することができる。アミノ酸配列の決定には、例えば、Edman分解法を用いることができる。このように決定されたアミノ酸配列をもとにして公開されたエアロパイラム・ペルニックス染色体DNA配列から、検索することで、本発明のDERAをコードする遺伝子の単離を行うことができる。さらに、このようにして得られるDERA酵素の遺伝子の配列に、1もしくは数個のヌクレオチドが欠失、置換もしくは付加などの改変を行って、本発明のDERA酵素の特性を損なわない程度に改変された機能的同等物を得ることもできる。上記のように単離されるDERA遺伝子を適切なベクターに挿入して発現され得る。本発明に用いられる発現ベクターは、市販の発現ベクターであり、宿主においてDERA酵素を発現するベクターであればよい。単離された遺伝子を大量発現させるためには、高発現ベクターの有する転写調節配列および翻訳調節配列の制御下に、作動可能にインフレームで、連結することが好ましい。このように

して得られたベクターを用いて任意の適切な宿主細胞に形質転換する。

【0009】宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現出来るものであればいずれも用いることができる。宿主細胞としては、大腸菌(*Escherichia* 属)以外に、例えば、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*)、コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*)、バチルス・ブレヴィス(*Bacillus brevis*)、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等をあげることができる。形質転換等、遺伝子組み替えの手法に関してはモレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル(Molecular Cloning, A laboratory manual)、第2版 Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に記載されている方法に準じて行うことができる。

【0010】単離された遺伝子によりコードされる酵素を産生する方法としては、形質転換された宿主細胞を適切な条件下で培養し、その培養物から目的とする酵素を精製する方法が挙げられる。培養に用いられる培地は、例えばLB培地、および2×YT培地のような通常微生物の増殖に用いられる培地であってもよいし、宿主細胞に適した特定の培地であってもよい。培養は、連続的あるいは回分的に行うことができる。

【0011】

【実施例】以下、実施例を用いてさらに詳細に説明するが、本願発明はこれらに限定されるものではない。

【0012】実施例1 エアロパイラム・ペルニックスの培養法

エアロパイラム・ペルニックスを培養するために、フィルターろ過した天然海水に0.5% ポリペプトン、0.3% 酵母エキス、0.076% チオ硫酸ナトリウムを加えた培地(NaOHでpH7.0に調整)を用いた。保存菌株を、試験管に入れた5mLの培地で90℃、48時間振とう培養し、この培養液は500mL容の坂口フラスコに入れた200mLの培地に植えつぎ、90℃、48時間振とう培養した。さらに2L容の坂口フラスコに入れた700mLの培地に培養液を植菌し、90℃、48時間好氣的に振とう培養した。

【0013】実施例2 エアロパイラム・ペルニックスからのDERA酵素精製法

実施例1による培養法により、約4Lの培地から培養した培養液から、遠心分離(7000rpm、20分)により集菌し、菌体を得た。さらに菌体は3% NaClで洗菌した後、菌体湿重量の4倍量の10mM Tris/HCl (pH8.0)に懸濁し、超音波破碎により破碎した。これを遠心分離(15000rpm、20分)してその上清を粗酵素液として得た。この粗酵素液に1% (w/v)になるように硫酸ストレプトマイシンを加え、20分間常温で放置したあと、遠心分離(15000rpm、20分)し、核酸を沈殿画分として取り除いた。得られた酵素液を10mM Tris/HCl (pH8.0)で平衡化したDEAE-

Toyopearl陰イオン交換クロマトグラフィー（東ソー製）にアブライし、同緩衝液で洗浄した後、0-0.5M NaClを含む緩衝液の直線濃度勾配溶出により溶出した。溶出液はフラクションコレクターを用いて分取し、活性画分を回収した。この回収した酵素液に硫酸アンモニウムを20%飽和濃度になるように加え、20%硫酸アンモニウムを含む10mM Tris/HCl (pH8.0)で平衡化したButyl-Toyop

earl疎水性相互作用クロマトグラフィー（東ソー製）にアブライした。平衡化に用いた緩衝液でカラムを十分に洗浄した後、20-0% 硫酸アンモニウムを含む緩衝液の直線濃度勾配により溶出した。溶出液はフラクションコレクターにより分取し、活性画分を回収した。（表1）

【0014】

【表1】

Steps	総活性(U)	総タンパク質(mg)	比活性(U/mg)	収率(%)
粗酵素液	2.33	908	0.0026	100
DEAE Toyopearl	0.650	91.7	0.0071	28
Butyl Toyopearl	0.403	3.33	0.121	17

（湿菌体重量約37g）

【0015】実施例3 本発明酵素の性質、特性
先行例との比較として、大腸菌由来のDERA (J. Am. Chem. Soc. 1995, vol 117 3333-3339 (1995年))との比較を一部の性質に関して行っている。先行例のDERA遺伝子導入組換え大腸菌は、アメリカンタイプカルチャーコレクション(ATCC)より、入手した。（登録番号ATCC86963）

【0016】（原理）活性測定はDERAによるデオキシリボース-5-リン酸の分解反応によって生じるグリセルアルデヒド-3-リン酸をトリオースリン酸イソメラーゼでジヒドロキシアセトンリン酸に変換し、これをグリセロール-3-リン酸脱水素酵素でNADHの340nmの吸収の減少を50℃で測定した。（図1参照）

【0017】（測定法）1mLの活性測定液組成（100mM Tris/HCl (pH8.0)、0.2mM デオキシリボース5リン酸(Deoxyribose-5-phosphate)、3.9Uトリオースリン酸イソメラーゼ(Triose phosphate isomerase (TPI))、11Uグリセロール3リン酸デヒドロゲナーゼ(Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH))、0.1mM NADH(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型)、酵素溶液)のうち、Deoxyribose-5-phosphate、TPI、G3PDH、NADHを除く組成を50℃で3分間インキュベートし、残りの組成を加え、分光光度計を用いて、50℃でのNADHの減少に伴う波長340nmの吸収の減少を1分間測定した。酵素活性の1単位(U)は50℃で1分間当たり1μmolのNADHを減少させる酵素量と定義し、また、NADHの340nmにおけるミリモル吸収係数は6.22mM⁻¹cm⁻¹とした。

【0018】活性最適温度

上記の活性測定法を用いて30-65℃で測定し、エアロバイラム・ペルニックス由来酵素（以下A. pernixと略）と大腸菌由来酵素（以下E. coliと略）のDERAの活性の最適温度を求めた（活性測定液中の酵素量はA. pernix, E. coliそれぞれ40μg, 0.2μg）。65℃以上の温度では活性測定に使用するTPIとG3PDHが失活するので測定できなかった。A. pernix由来酵素は、大腸菌由来酵素が65℃で活性を失うのに比べて、高い活性を示した。結果を図2に示す。

【0019】酵素の耐熱性の評価

次にA. pernixとE. coliのDERAの耐熱性を測定するため、40-90℃で10分間処理した後、A. pernixは50℃、E. coliは40℃で活性測定し、熱処理していない酵素活性を1としてその残存活性をもとめた。E. coli由来のDERAが、70℃の熱処理で失活したのに比べ、A. pernix由来の酵素は、90℃の熱処理においても活性を失わず、高い耐熱性を示した。結果を図3に示す。

【0020】次にA. pernixのDERAについて80℃で各時間熱処理し、未処理酵素の活性を1として残存活性を調べた。A. pernix由来の酵素は、80℃ 60分の熱処理においても活性低下がほとんど認められず、高い耐熱性を示した。結果を図4に示す。

【0021】実施例4 酵素N末端アミノ酸配列の決定
酵素N末端アミノ酸配列は上記の精製法に従って得た精製酵素をSDS-PAGEにかけ、分子量約25,000Da付近に認められたバンドのN末端配列をプロテインシーケンサーでエドマン分解法により解析した。得られた配列を配列番号4に示す。

【0022】上記の方法により解析したN末端配列を、ヌクレオチド配列に変換しエアロバイラム・ペルニックスの全ゲノムデータベースを検索することで、配列番号1のDERAをコードする遺伝子を特定できた。N末端解析により決定した配列をもとに、NdeI及びBamHIの各制限酵素サイトを付加したプライマー、DERA-NdeI（配列番号6）及びDERA-BamHI（配列番号7）を設計した。（DERAの開始コドンTTGは大腸菌での発現のためATGに変換している。）

【0023】実施例5 エアロバイラム・ペルニックス染色体DNAの調製

実施例1で得られた菌体を培養終了後、遠心分離（5000g、10分）により集菌し、3% NaClで洗菌を行った。菌体湿重量2gの菌体を8mlのTE緩衝液（10mM Tris-HCl (pH7.5)、1mM EDTA）に懸濁した。菌体懸濁液に10mg/ml Lysozyme 2ml、10mg/ml RNAase 100μlを加え37℃で、30分間インキュベーションした後、20mg/ml Proteinase K 50μlを加え、10分後、30mg/ml N-Lauroylsarcosine Na 1mlを加えて、さらに45分間インキュベーションした。当量のCl（クロロホルム：イソアミルアルコール=24:1）

を加え穏やかに混和し、遠心分離(7000g、15分間)して、水層を分取した。同じ操作をもう一度繰り返した後、次にPCI(水平衡化フェノール:Cl=1:1)処理をCl処理と同様に2回繰り返した。さらに2回Cl処理した後、0.1倍量の3M酢酸ナトリウムを加えて攪拌し、当量のイソプロパノールを加えて軽く攪拌した。析出したDNAをディスポチューブで巻き取り、70%エタノールで、洗浄し乾燥させ、TE緩衝液 500 μ l に溶解した。

【0024】実施例6 エアロパイラム・ペルニックスからのDERA遺伝子のクローニング

実施例5で得られた染色体溶液50 μ l を制限酵素EcoRI 5 μ l、SphI 5 μ l、により37℃で、一昼夜酵素消化をおこなった。一方、pUC18を同様にEcoRI 2 μ l、SphI 2 μ lにより、37℃で、一昼夜酵素消化をおこなった。こうして得られたゲノムDNA及びpUC18をDNA Ligation Kit-Ligation high(東洋紡製)を用いて、キットのプロトコールに従いライゲーションした。次に、調製した組換えプラスミドを用いて大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換はコンピテントセルとプラスミドを氷上で、30分間接触させた後、ヒートショック(42℃、45秒間)により行った。形質転換したコンピテントセルを50 μ g/mlアンピシリン及び1mM IPTG、20 μ g/ml X-galを含むLB平板寒天培地(1L中トリプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl 10g)に植菌し、37℃で、一晚培養した。寒天培地上に形成されたシングルコロニーの中から、白色コロニーを無作為にいくつか選択し、各コロニーを直接反応溶液に懸濁し、配列番号6、7のプライマーを用いてPCRを行うことで目的の断片をもつクローンのスクリーニングを行った。反応にはTaqポリメラーゼ(宝酒造製)を使用し、以下の手順で行った。すなわち緩衝液(10xTaqBuffer 宝酒造製)を1 μ l、各2.5mMになるように調製したdNTP混合溶液を0.8 μ l、上記プライマーDNAを各々10pmol、前記DNAポリメラーゼを0.1 μ l加えて、全量10 μ lとした。市販の温度サイクリング装置(Thermal Cycler ASTEC製)を用いて<94℃、1分-55℃、1分-72℃、1分>のサイクルを30回繰り返した。反応終了後、アガロース電気泳動により、目的の断片の増幅が行われているかを確認し、陽性コロニーから、目的のDERA遺伝子を含む組換えプラスミド(pUC18/deraと呼ぶ)を調製した。

【0025】実施例7 大量発現系の構築

上記で調製したpUC18/deraをテンプレートとして、配列番号配列番号6、7のプライマーを用いてPCRを行うことで目的の断片を増幅した。反応には、KODポリメラーゼ

(東洋紡製)を使用し、以下の手順で行った。すなわち緩衝液を10 μ l、各2.5mMになるように調製したdNTP混合溶液を3 μ l、上記プライマーDNAを各々50pmol、前記DNAポリメラーゼを1 μ l加えて、全量50 μ lとした。市販の温度サイクリング装置(Thermal Cycler ASTEC製)を用いて<94℃、15秒-65℃、2秒-74℃、30秒>のサイクルを25回繰り返した。反応終了後、アガロース電気泳動により、目的の断片を切り出して抽出、精製し、少量のTE緩衝液に溶解した。上記で得た断片をNdeI、BamHIで処理し、アガロース電気泳動したのち目的の配列のバンドを切り出して抽出、精製し、少量のTE緩衝液に溶解した。pET15bを同制限酵素で処理し、インサートとライゲーションを行った。この組換えプラスミドを用いて、大腸菌JM109株を形質転換し、LB平板寒天培地に植菌し、形成したコロニーをダイレクトPCRによって、スクリーニングし、陽性コロニーより、組換えプラスミドを調製した。(pET15b/deraと呼ぶ)

pET15b/deraを用いて、大腸菌BL-21(DE3)株の形質転換を行った。形質転換した大腸菌は、50 μ g/mlアンピシリンを含むLB平板寒天培地に植菌し、37℃で培養した。

【0026】実施例8 組換え大腸菌の培養

組換え大腸菌は、50 μ g/mlアンピシリンを含むSB(1L中、トリプトン 12g、酵母エキス 24g、グリセロール5mL、K2HPO4 12.5g、KH2PO4 3.8g)培地100mlに実施例7の平板寒天培地に形成したコロニーから植菌し、37℃で、OD660=0.6になるまで培養した後、終濃度が1mMになるようにIPTG(イソプロピル β -チオガラクトピラノシド)を加え、さらに3時間培養した。培養終了後、遠心分離(5000g 10分)により、集菌し、0.85%NaClで、洗菌し、湿菌体重量の9倍量の10mMTris-HCl(pH7.5)緩衝液に懸濁させ、超音波破碎後、遠心分離し、上清を粗酵素液とした。粗酵素液を80℃で、10分間インキュベーションし、遠心分離により熱変性した不溶性タンパクを除去した。ニッケルをチャージした金属アフィニティーカラム(Hi Trap affinity columns (Pharmacia Biotech製))に、0.5M NaCl、10mMイミダゾールを含む10mMTris-HCl(pH7.5)緩衝液で、平衡化した後、熱処理後の粗酵素液吸着させ、イミダゾール濃度を0.1M、0.2M、0.3M、0.4M、0.5Mと段階的に上昇させて、活性画分を回収した。

(表2)

【0027】

【表2】

Steps	総活性(U)	総タンパク質(mg)	比活性(U/mg)	収率(%)
熱処理	31.5	34.2	0.991	100
金属アフィニティー カラム	21	15.1	1.39	67

(湿菌体重量約1.4g)

【0028】この画分をSDS-PAGE電気泳動し、泳動後タ

ンパク質染色した。結果を図5に示す。

【0029】

【発明の効果】本発明によって、耐熱性が高い2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼが得られた。この酵素は大腸菌などの培養に適した微生物によって生産させた後、熱処理により簡便に精製でき安価に安定して供給

することができる。

【0030】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<:110>: UBE INDUSTRIES, LTD

<:120>: Thermophilic 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase

<:130>: Thermophilic DERA from A. pernix

<:140>:

<:141>:

<:160>: 7

<:170>: PatentIn Ver. 2.1

<:210>: 1

<:211>: 708

<:212>: DNA

<:213>: Aeropyrum pernix K1 JCM9820

<:400>: 1

```

ttgccgtcgg ccagggatat actgcagcag ggtctagaca ggctaggagg ccctgaggac 60
ctgcctcga ggatagactc tacgctaact agccctaggg ctacggagga ggacgttagg 120
aatcttgtga gagaggcgtc ggactacggg tttagatgcg cggttctgac tccagtgtac 180
acagtaaaga tttctgggct ggctgagaag cttgggtgtga agctatgtag cgttataggc 240
tttccctcgg gccaggcccc gctcagaggta aagctagtgt aggacaaaac tgttttagag 300
gctggggcta ctgagcttga tgttgtcccc catctctcac taggccccga agctgtttac 360
agggaggtct cagggatagt gaagttagcg aaaagctatg gagccgttgt gaaagtaata 420
ttagaagcgc cactctggga tgacaaaacg ctctccctcc tgggtgactc gtcgaggagg 480
gcggggcgcg atatagtga gacaagcacc ggggtctata caaagggtgg tgatccagta 540
acgggtcttc ggtggccag tcttgccaag ccccttggtg tgggtgtaaa ggcaagcggc 600
ggtataagga gtggcatcga cgcgctctc gccgtaggag ctggcgcgga tatcataggg 660
acaagcagtg ctgtaaaggt tttggagagc ttcaaatccc tagtctaa 708

```

<:210>: 2

<:211>: 235

<:212>: PRT

<:213>: Aeropyrum pernix K1 JCM9820

<:400>: 2

```

Met Pro Ser Ala Arg Asp Ile Leu Gln Gln Gly Leu Asp Arg Leu Gly
  1           5           10          15
Ser Pro Glu Asp Leu Ala Ser Arg Ile Asp Ser Thr Leu Leu Ser Pro
      20           25           30
Arg Ala Thr Glu Glu Asp Val Arg Asn Leu Val Arg Glu Ala Ser Asp
      35           40           45
Tyr Gly Phe Arg Cys Ala Val Leu Thr Pro Val Tyr Thr Val Lys Ile
      50           55           60
Ser Gly Leu Ala Glu Lys Leu Gly Val Lys Leu Cys Ser Val Ile Gly
      65           70           75          80
Phe Pro Leu Gly Gln Ala Pro Leu Glu Val Lys Leu Val Glu Ala Gln
      85           90           95
Thr Val Leu Glu Ala Gly Ala Thr Glu Leu Asp Val Val Pro His Leu
      100          105          110
Ser Leu Gly Pro Glu Ala Val Tyr Arg Glu Val Ser Gly Ile Val Lys

```

115 120 125
 Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Val Val Lys Val Ile Leu Glu Ala Pro
 130 135 140
 Leu Trp Asp Asp Lys Thr Leu Ser Leu Leu Val Asp Ser Ser Arg Arg
 145 150 155 160
 Ala Gly Ala Asp Ile Val Lys Thr Ser Thr Gly Val Tyr Thr Lys Gly
 165 170 175
 Gly Asp Pro Val Thr Val Phe Arg Leu Ala Ser Leu Ala Lys Pro Leu
 180 185 190
 Gly Met Gly Val Lys Ala Ser Gly Gly Ile Arg Ser Gly Ile Asp Ala
 195 200 205
 Val Leu Ala Val Gly Ala Gly Ala Asp Ile Ile Gly Thr Ser Ser Ala
 210 215 220
 Val Lys Val Leu Glu Ser Phe Lys Ser Leu Val
 225 230 235

<:210>: 3

<:211>: 582

<:212>: DNA

<:213>: Aeropyrum pernix K1 JCM9820

<:400>: 3

gtgagagagg cgtcggacta cgggtttaga tgcgcggttc tgactccagt gtacacagta 60
 aagatttctg ggctggctga gaagcttggg gtgaagctat gtagcgttat aggctttccc 120
 ctgggccagg ccccgctcga ggtaaagcta gttgaggcac aaactgtttt agaggctggg 180
 gctactgagc ttgatgttgt ccccatctc tcactaggcc ccgaagctgt ttacaggagg 240
 gtctcaggga tagtgaagtt ggcgaaaagc tatggagccg ttgtgaaagt aatattagaa 300
 gcgccactct gggatgacaa aacgctctcc ctctggtgg actcgtcgag gagggcgggg 360
 gcggatatag tgaagacaag caccggggtc tatacaaagg gtggtgatcc agtaacggtc 420
 ttcaggctgg ccagtcctgc caagcccctt ggtatgggtg taaaggcaag cggcgggtata 480
 aggagtggca tcgacgccgt cctcgccgta ggagctggcg cggtatcatc agggacaagc 540
 agtgctgtaa aggttttga gagcttcaaa tccctagtct aa 582

<:210>: 4

<:211>: 10

<:212>: PRT

<:213>: Aeropyrum pernix K1 JCM9820

<:400>: 4

Pro Ser Ala Arg Asp Ile Leu Gln Gln Gly
 1 5 10

<:210>: 5

<:211>: 708

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:one base change
 from No1 for E.coli transduction

<:400>: 5

atgccgtcgg ccagggatat actgcagcag ggtctagaca ggctagggag ccctgaggac 60
 ctgcctcga ggatagactc tacgtacta agccctaggg ctacggagga ggacgttagg 120
 aatcttgtga gagaggcgtc ggactacggg tttagatgcg cggttctgac tccagtgtac 180
 acagtaaaga tttctgggct ggctgagaag ctgtgtgtga agctatgtag cgttataggc 240

tttccctgg gccaggcccc gtcgaggta aagctagttg aggcacaaac tgttttagag 300
 gctggggcta ctgagcttga tgtgtcccc catctctcac taggccccga agctgtttac 360
 agggagggtct cagggatagt gaagttggcg aaaagctatg gagccgttgt gaaagtaata 420
 ttagaagcgc cactctggga tgacaaaacg ctctccctcc tgggtgactc gtcgaggagg 480
 gcggggggcgg atatatgaa gacaagcacc ggggtctata caaagggtgg tgatccagta 540
 acggtcttca ggcgtggcag tcttgccaag ccccttggtg tgggtgtaaa ggcaagcggc 600
 ggtataagga gtggcatcga cgccgtcctc gccgtaggag ctggcgcgga tatcataggg 660
 acaagcagtg ctgtaaaggt tttggagagc ttcaaatccc tagtctaa 708

<:210>: 6

<:211>: 30

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:primer

<:400>: 6

tatatcatat gccgtcggcc agggatatac

30

<:210>: 7

<:211>: 30

<:212>: DNA

<:213>: Artificial Sequence

<:220>:

<:223>: Description of Artificial Sequence:primer

<:400>: 7

ttatggatcc ttagactagg gattgaagc

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 DERA活性測定における原理図である。

【図2】 図2は、本発明酵素の活性の温度依存性を示すものである。

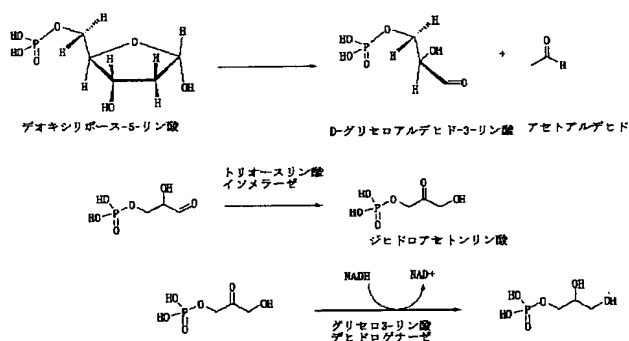
【図3】 図3は、本発明酵素の熱処理温度と残存活性を

示すものである。

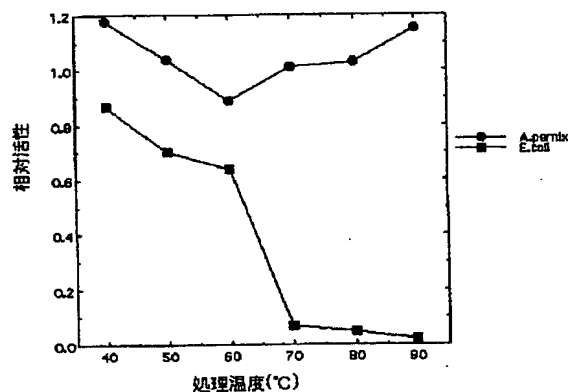
【図4】 図4は、本発明酵素の耐熱性を示すものである。

【図5】 図5は本発明に係るDERAをSDS-PAGEにかけた結果であり、精製度および分子量を示すものである。

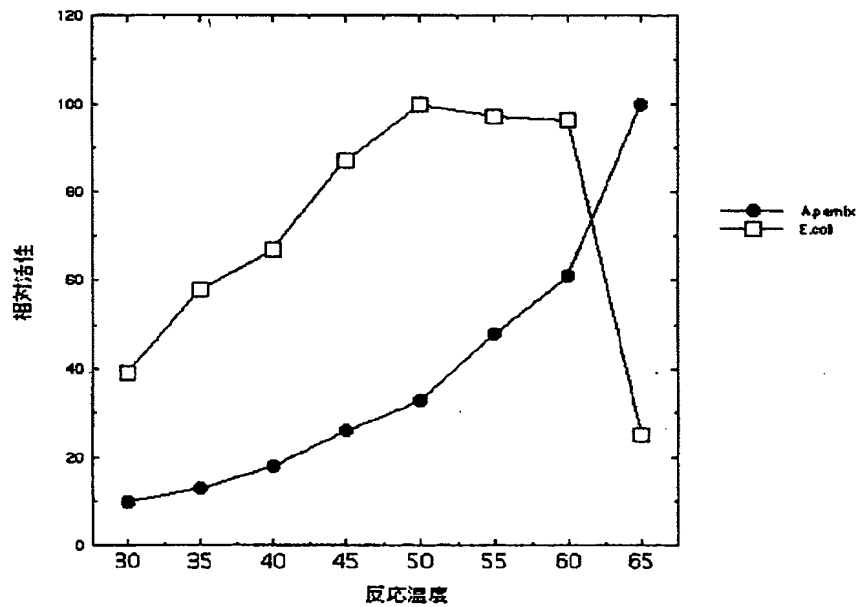
【図1】



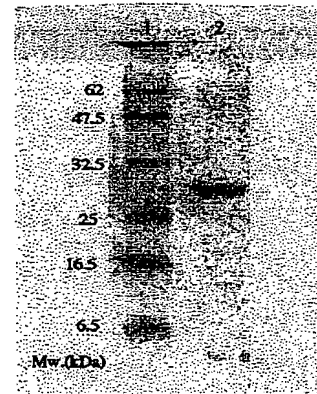
【図3】



【図2】

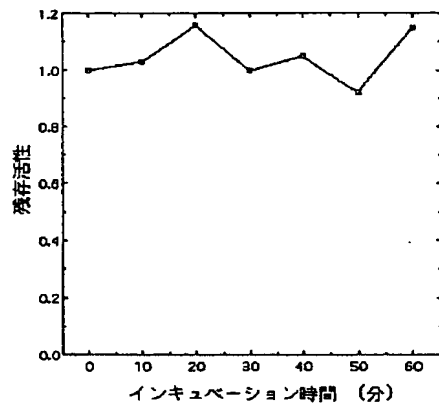


【図5】



1: 分子量マーカー
2: 組換えDEFA

【図4】



フロントページの続き

(72) 発明者 吉田 洋一
 山口県宇部市大字小串1978番地の5 宇部
 興産株式会社宇部研究所内
 (72) 発明者 下家 郁子
 徳島県徳島市北常三島町3丁目4-3 ア
 ンピロン 3-E

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA07 CA02 DA06
 HA03
 4B050 CC01 CC03 DD02 LL01 LL05
 4B065 AA26 AB01 BA02 CA27 CA44
 CA47